

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan metode *Post Test Only Control Group Design* yaitu dilakukan perhitungan jumlah sel busa (*foam cell*) pada aorta tikus setelah diberi perlakuan.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang selama 30 hari.

4.3 Populasi dan Sampel

4.3.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah semua tikus putih jantan (*Rattus Novergicus strain wistar*).

4.3.2 Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus Novergicus strain wistar*) yang sesuai dengan kriteria inklusi.

4.3.3 Besar Sampel

Rentang besar sampel yang digunakan ditentukan dengan rumus :

$$DF = N - k = kn - k = k (n - 1)$$

Dimana DF adalah *Degrees of freedom*, N adalah total sampel, n adalah total sampel di tiap kelompok, dan k adalah jumlah kelompok.

Sehingga, dengan formula diatas, besar sampel di tiap kelompok ditentukan dengan rumus :

$$n = DF/k + 1$$

Rentang DF yang bisa diterima adalah 10 sebagai nilai minimum dan 20 sebagai nilai maksimum. Sehingga rumus nya menjadi :

- Minimum $n = 10/k + 1$ à nilai minimum n penelitian ini $= 10/3 + 1$
 $= 4,34 \approx 5$ sampel/grup
- Maksimum $n = 20/k + 1$ à nilai maksimum n penelitian ini $=$
 $20/3+1 = 7,67 \approx 8$ sampel/grup

Dan rumus total sampel adalah :

- Minimum $N = \text{minimum } n \times k$ à maka total sampel minimum : 5
 $\times 3 = 15$ sampel
- Maksimum $N = \text{maksimum } n \times k$ à maka total sampel maksimum :
 $8 \times 3 = 24$ sampel

(Arifin & Zahiruddin, 2017)

Berdasarkan nilai minimum dan maksimum total sampel, maka rentang besar sampel pada penelitian ini adalah 15 - 24 sampel. Dimana jumlah sampel yang akan digunakan untuk penelitian ini adalah sebanyak 15 sampel yang dibagi menjadi 3 kelompok, sehingga setiap kelompok diisi oleh 5 ekor tikus putih jantan (*Rattus norvegicus strain wistar*).

4.3.4 Teknik Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dengan menggunakan teknik *Simple Random Sampling* terhadap tikus putih jantan (*Rattus Novergicus strain wistar*) menyesuaikan dengan kriteria penelitian yang sudah ditentukan.

4.3.5 Karakteristik Sampel Penelitian

A. Kriteria Inklusi

1. Tikus putih dewasa, umur 8 - 12 minggu

2. Berat badan 100 - 200 gram
3. Jenis kelamin jantan, strain wistar
4. Dalam situasi sehat yang ditandai dengan gerakan yang aktif dan mata yang jernih.

B. Kriteria Eksklusi

1. Tikus yang cacat sebelum perlakuan
2. Tikus pernah diberi perlakuan sebelumnya
3. Tikus yang selama aklimatisasi tidak mau makan

C. Kriteria *Drop-out*

1. Tikus yang sakit selama proses perlakuan karena berbagai sebab.
2. Tikus yang mati selama proses perlakuan karena berbagai sebab.

4.3.6 Variabel Penelitian

4.3.6.1 Variabel bebas

Variabel bebas penelitian ini adalah asap rokok elektronik dan asap rokok konvensional yang merupakan skala nominal.

4.3.6.2 Variabel terikat

Variabel terikat penelitian ini adalah jumlah sel busa (*foam cell*) pada gambaran histopatologi aorta yang merupakan skala rasio.

4.3.7 Definisi Operasional

- a. Paparan asap rokok konvensional adalah pemberian asap rokok kretek merk Dji Sam Soe yang memiliki kandungan nikotin 2,3 mg sebanyak 5 batang kepada hewan coba yang ditempatkan

dalam smoking box sebanyak 2 kali pemaparan sehari selama 30 hari.

- b. Paparan asap rokok elektronik adalah pemberian asap rokok elektronik aspire dengan 4 ml *e-liquid* yang mengandung 3 mg nikotin kepada hewan coba yang ditempatkan dalam smoking box sebanyak 2 kali sehari selama 30 hari.
- c. Sel busa adalah sel makrofag yang membengkak dan dipenuhi dengan lipid pada gambaran histopatologi arkus aorta hewan coba dengan pewarnaan hematoksilin-eosin. Pembacaan preparat menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x pada 5 lapang pandang yang dilakukan di bawah supervisi ahli patologi anatomi dr. Dian Yuliarta L., Sp.PA.

4.4 Alat dan Bahan

4.4.1 Alat

- a. Alat pemeliharaan tikus
 - 1. Kandang tikus
 - 2. Penutup kandang dari anyaman kawat
 - 3. Botol air
- b. Alat pembedahan tikus
 - 1. Gunting bedah
 - 2. Pinset
 - 3. Tempat darah (botol sediaan)
 - 4. Sarung tangan
 - 5. Pengait jaringan

- 6. Jarum
- 7. Papan bedah
- c. Alat paparan asap rokok
 - 1. *Smoking box*
 - 2. *Pipa three ways*
 - 3. *Smoking pump*
 - 4. Sduit 5cc
 - 5. Rokok elektronik
- d. Alat lain
 - 1. Mikroskop
 - 2. Neraca berat badan
 - 3. Masker
 - 4. Jas laboratorium

4.4.2 Bahan

- a. *E-liquid*
- b. Rokok konvensional
- c. Makanan tikus yang merupakan comfeed BR-1

4.5 Prosedur penelitian

4.5.1 Aklimatisasi

Tikus di aklimatisasi selama tujuh hari sebelum pembagian kelompok tikus dengan tujuan agar tikus dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru. Selama aklimatisasi tikus diberi pakan BR-1 satu kali sehari, jika ada kelebihan sisa pakan maka sisanya dibuang dan diganti dengan yang baru untuk keesokan harinya. Tikus juga diberi minum dengan aquades secukupnya. Pada masa ini, berat badan tikus ditimbang.

4.5.2 Pembagian Kelompok Tikus

Tikus yang digunakan sebanyak 15 ekor yang dibagi menjadi 3 kelompok dan setiap kelompok terdiri dari 5 ekor :

1. Kelompok 1 : Kontrol normal dengan pemberian pakan standar BR-1 dan minum standar tanpa pemberian paparan asap rokok konvensional dan asap rokok elektronik selama 30 hari.
2. Kelompok 2 : Pemberian pakan standar BR-1 dan minum standar dengan pemberian paparan asap rokok kretek 10 batang dalam 2 kali pemaparan perhari selama 30 hari.
3. Kelompok 3 : Pemberian pakan standar BR-1 dan minum standar dengan pemberian paparan asap rokok elektronik dengan kandungan nikotin 3 mg sebanyak 3 ml dalam 2 kali pemaparan perhari selama 30 hari.

4.5.3 Dasar Penentuan Dosis

Dasar penentuan dosis paparan asap rokok elektronik dan konvensional adalah penelitian tentang “Gambaran Histopatologi Ventrikel Kiri Tikus Jantan yang diberi Paparan Rokok Elektrik (ENDS) dan Rokok Konvensional”. Penelitian tersebut memberikan dosis paparan asap rokok elektronik sebanyak 6 ml *e-liquid* yang mengandung 3 mg nikotin per-ml dan rokok konvensional sebanyak 10 batang rokok kretek yang mengandung 3 mg nikotin per-batang , namun karena keterbatasan bahan pada penelitian ini mengganti rokok konvensional menjadi 10 batang rokok kretek yang mengandung 2.3 mg nikotin per-batang dan 8 ml *e-liquid* rokok elektronik yang mengandung 3 mg nikotin per-ml.

4.5.4 Proses Anastesi dan Pembedahan Hewan Coba

a. Proses anastesi:

Proses anastesi pada hewan uji satu-satu dengan memasukan hewan coba ke toples kaca dengan kapas yang dicampur kloroform selama ± 60 detik yang dihitung dengan menggunakan stopwatch.

b. Proses pembedahan

Setelah teranastesi dengan baik, hewan coba diposisikan pada meja lilin lalu keempat kaki itu difiksasi. Memakai gunting bedah pembedahan abdomen hingga setinggi leher dilakukan. Setelah bersih, Arkus aorta diambil dan disimpan dalam tabung plastik dengan tambahan formalin.

c. Penanganan hewan coba setelah pembedahan

Hewan coba yang sudah dibedah, pastikan kembali tidak ada *recovery* pada hewan coba. Jika terdapat *recovery* lakukan prosedur euthanasia. Selanjutnya hewan coba yang sudah dipastikan mati, dikumpulkan menjadi satu lalu dikubur.

4.5.4 Pembuatan Preparat Histologi

Pembuatan preparat histopatologi dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit dr. Saiful Anwar, dengan metode iris yang dilanjutkan dengan pengecatan *Hematoksilin-Eosin*.

1. Proses Bahan dan Jaringan

a. Fiksasi dan Pencucian

Organ difiksasi dengan formalin buffer 10% untuk mencegah kerusakan jaringan. Sebelum diproses menjadi preparat histopatologi,

jaringan dicuci dengan air minimal 1,5 jam untuk menghilangkan bahan fiksasi.

b. Dehidrasi

Dilakukan dehidrasi ringan bertingkat dengan maksud untuk menghilangkan air agar jaringan tidak mengkerut. Dehidrasi ini dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- a) Jaringan dimasukkan dalam alkohol 80% selama 1 jam
- b) Jaringan dimasukkan dalam alkohol 95% selama 1 jam, diulang 2 kali
- c) Jaringan dimasukkan dalam alkohol 100% selama 1 jam, diulang 3 kali.

c. Clearing

Jaringan dimasukkan dalam xylol 2 kali, masing-masing 1 jam, untuk menghilangkan alkohol.

d. Parafinisasi

Jaringan dimasukkan dalam parafin yang dipanaskan dalam kompor selama 3 jam agar tetap cair. Hal ini dimaksudkan agar konsentrasi parafin sama dengan jaringan pada waktu diblok.

2. Pembuatan Blok

- a. Pada cetakan dipasang label untuk identifikasi.
- b. Parafin cair dimasukkan dalam cetakan.
- c. Jaringan ditempatkan pada posisi yang diinginkan dalam parafin tersebut, kemudian disiram dengan parafin cair secukupnya.
- d. Parafin dibiarkan sampai dingin.

3. Pemasangan dan Pemotongan Blok Parafin

- a. Letak jaringan dalam blok parafin harus diperhatikan. Bagian blok dibelakang dilekatkan pada kayu pemegang blok dengan cara memanaskan parafin.
- b. Memasang pemegang blok pada mikrotom dan memasang pisau mikrotom pada posisinya. Mengatur posisi indikator yang menunjukkan ketebalan potongan.
- c. Pemotongan secara rutin adalah 6-10 mikron.
- d. Hasil pemotongan saling bersambungan membentuk pita. Ujung pita diangkat dengan kuas dan direntangkan diatas permukaan air hangat ($45-50^{\circ}\text{C}$). Pita direntangkan secara lembut dan lurus tanpa lipatan.

4. Pemasangan Pita Sayatan pada *Object glass*

- a. *Object glass* dilapisi dengan lapisan putih telur yang tipis sebagai bahan perekat dan dibiarkan kering.
- b. Pita parafin dipotong dengan silet yang dibubuhi xylol dan potongan dibiarkan diatas air.
- c. *Object glass* dicelupkan ke bawah pita parafin, kemudian pita tersebut diangkat dengan object glass.
- d. *Object glass* dimasukkan dalam incubator suhu 30°C selama 30 menit sampai 3 jam.

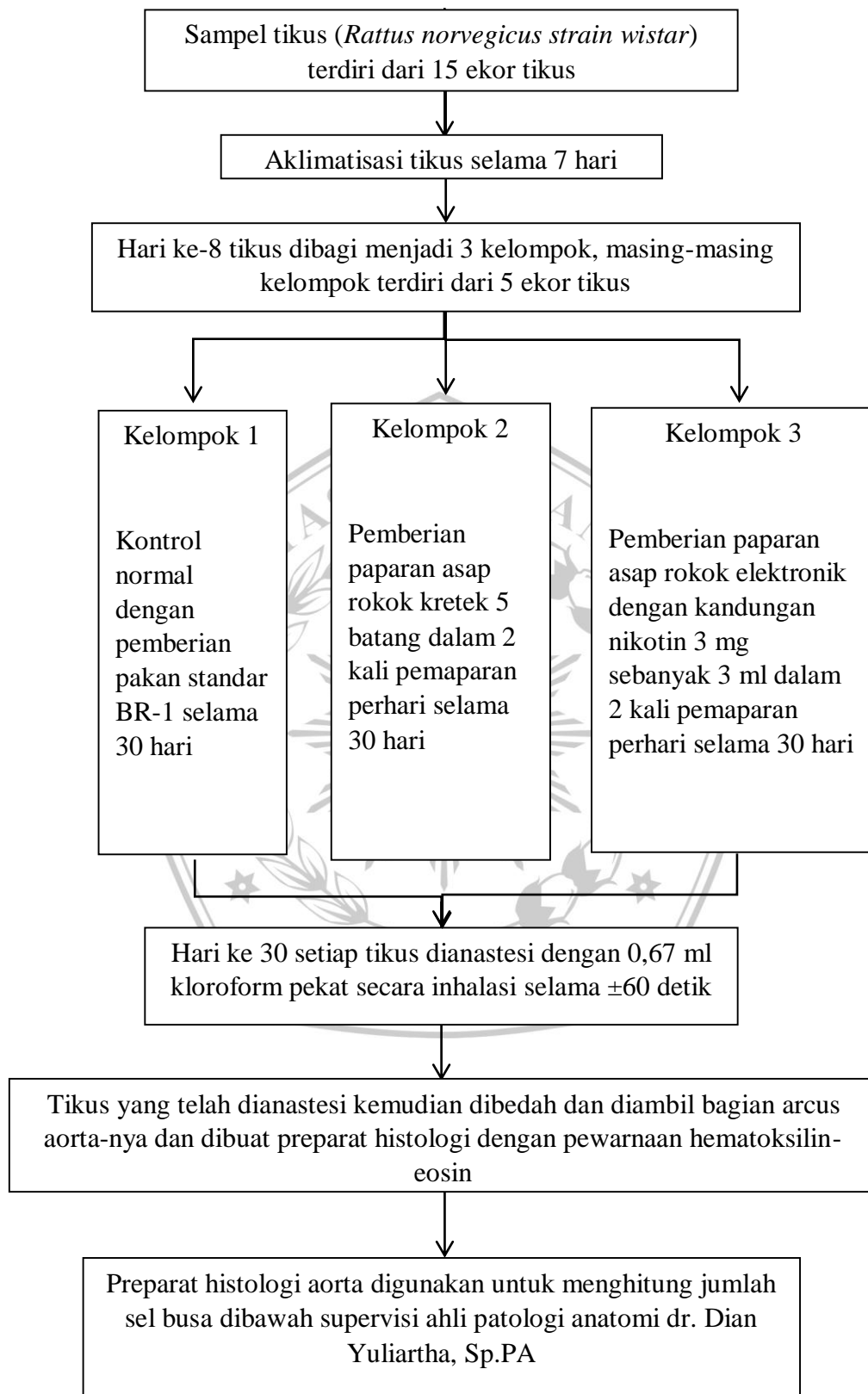
5. Pewarnaan *Hematoksin-Eosin*

- Deparafinisasi. *Object glass* dimasukkan dan direndam dalam xylol selama 5 menit, diulang 3 kali. Ini bertujuan untuk menghilangkan sisa parafin pada jaringan yang akan dicat.
- Hidrasi. *Object glass* dimasukkan ke dalam alkohol 96%, alkohol 95%, dan alkohol 80% masing-masing selama 2 menit. Hal ini dimaksudkan untuk menambahkan air secara bertahap, agar jaringan tidak mengkerut.
- *Object glass* dimasukkan dalam *Hematoksilin* selama 15 menit dan dicuci dengan air mengalir selama 20 menit.
- *Object glass* dimasukkan dalam alkohol asam 2-3 celup, kemudian dibilas dengan air mengalir selama 2 menit.
- *Object glass* dimasukkan dalam *Eosin* 1% selama 0,5-1 menit.
- Dehidrasi. *Object glass* dimasukkan dalam alkohol 80% selama 5 menit, selanjutnya dimasukkan dalam alkohol 95% selama 5 menit.

6. Penjernihan dan Mounting

Object glass dimasukkan ke dalam xylol selama 5 menit, diulang 3 kali. Setelah itu, tetesi dengan Canadian Balsem atau Entellan pada permukaan *object glass* lalu tutup dengan *cover glass*.

4.6 Alur Penelitian



4.7 Analisa Data

Data-data yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisa menggunakan uji normalitas, uji homogenitas, uji post hoc test yang pengolahannya menggunakan SPSS 24 :

1. Uji *One Way Anova* bertujuan untuk menguji hipotesis kesamaan rata-rata antar kelompok (> 2 kelompok dan tidak berpasangan) dan untuk menguji apakah rata-rata antar sampel berbeda secara signifikan. Jika diperoleh $\alpha < 0,05$ artinya terdapat perbedaan yang bermakna, namun sebaliknya jika $\alpha > 0,05$ berarti tidak ada perbedaan yang bermakna. *One Way Anova* dapat dilakukan dengan syarat sebaran data normal dan homogen yang dapat diketahui melalui uji normalitas (uji *Saphiro-Wilk*) dan homogenitas (uji *Levene Test*). Apabila sebaran data tidak normal perlu dilakukan transformasi data dan diuji normalitas kembali. Jika tetap tidak normal maka digunakan uji *Kruskal Wallis* dan uji *Post-Hoc Mann Whitney*
2. Uji *Post Hoc* merupakan lanjutan dari uji *One Way Anova*. Uji *Post Hoc* dilakukan untuk mengetahui perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan dalam penelitian. Jika hasil uji homogenitas menunjukkan ragam data homogen maka digunakan uji *Post Hoc Bonferroni*, sebaliknya jika sebaran data tidak homogen digunakan uji *Post Hoc Tamhane*.

4.8 Jadwal Penelitian

Tabel 4. 1 Jadwal Penelitian

No	Jenis Kegiatan	Minggu								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.	Pembelian dan adaptasi	X								
2.	tikus		X	X	X	X				
3.	Pemberian perlakuan						X			
4.	Pembedahan						X	X		
5.	Pengumpulan data								X	X
6.	Analisis data								X	X
	Konsultasi dan revisi									

